DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.07.008
第26卷第7期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 7
580 2004年4月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Apr. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)07-0580-04

胃癌和胃癌前病变 bcl-2 基因表达及其对细胞凋亡的调控作用

刘海峰,刘为纹,房殿春,王国安,滕小春,陈 刚 (第三军医大学西南医院全军消化内科中心,重庆 400038)

提 要:目的 探讨胃癌前病变及胃癌中 bcl-2 基因表达状况及其与细胞凋亡的关系。方法 应用原位杂交和免疫组织化学技术检测10例正常胃粘膜、72例慢性萎缩性胃炎和53例胃癌中 bcl-2 基因的表达,并采用凋亡细胞原位检测方法对组织切片中的凋亡细胞进行观察和比较。结果 bcl-2 基因在正常胃粘膜及不同胃粘膜病变中均有不同程度的表达。bcl-2 mRNA 在胃癌组织中的表达率为77.36%,显著高于正常胃粘膜、萎缩性胃炎及肠化生(20.00%,25.00%,44.44%,$P<0.01$);异型增生组织 bcl-2 mRNA 表达率为75.00%,显著高于正常胃粘膜及萎缩性胃炎($P<0.05$)。胃癌组织 bcl-2 蛋白表达率为81.13%,显著高于正常胃粘膜、萎缩性胃炎及肠化生(20.00%,31.25%,52.78%,$P<0.01$),异型增生组织 bcl-2 蛋白表达率为75.00%,显著高于正常胃粘膜及萎缩性胃炎($P<0.01$)。χ^2 检验表明两种方法检测阳性率差异无显著性。凋亡细胞原位检测结果显示,bcl-2 蛋白表达阳性肠化生和胃癌组织中的凋亡细胞指数显著低于 bcl-2 蛋白阴性组($P<0.05$及$P<0.01$),bcl-2 蛋白表达状态与细胞凋亡指数呈负相关。结论 bcl-2 基因对胃癌前组织及胃癌细胞凋亡具有抑制性调控作用,细胞凋亡调控异常在胃癌发病中可能起重要作用。

关键词:胃肿瘤;癌前状态;基因表达;细胞凋亡
中图法分类号:R329.28;R730.23;R735.2 文献标识码:A

Expression of bcl-2 gene in gastric carcinoma and precancerous lesions and its regulatory role in apoptosis

LIU Hai-feng, LIU Wei-wen, FANG Dian-chun, WANG Guo-an, TENG Xiao-chun, CHEN Gang (Gastroenterology Research Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To elucidate the relationship between bcl-2 gene expression and the frequency of apoptosis in different stages of malignant transformation of gastric epithelium in precancerous lesions and gastric carcinomas. **Methods** *In situ* hybridization and immunohistochemical method were used to study the frequencies of bcl-2 gene expression in 10 cases of normal gastric mucosa, 72 cases of chronic atrophic gastritis, and 53 cases of gastric carcinoma. Meanwhile, the method of *in situ* apoptotic cell detection was adopted to detect the apoptotic cells in these lesions. The relationship of the number of apoptotic cells with the bcl-2 gene expression in each case was observed. **Results** *In situ* hybridization revealed that the positive frequency of bcl-2 gene expression in gastric carcinoma was significantly higher than that in normal gastric mucosa, atrophic gastritis, and intestinal metaplasia ($P<0.01$ and $P<0.05$); and that the positive frequency of bcl-2 gene expression in gastric dysplasia was significantly higher than that in normal gastric mucosa and in atrophic gastritis ($P<0.05$). The expression rate of bcl-2 protein detected by immunohistochemistry was significantly higher in gastric carcinoma than that in normal gastric mucosa, atrophic gastritis, and intestinal metaplasia ($P<0.01$), and remarkably higher in gastric dysplasia than that in normal gastric mucosa and atrophic gastritis ($P<0.01$). There was no significant difference between the positive rates obtained by these 2 methods. Observation of the relationship of bcl-2 expression with the number of apoptotic cells in these specimens revealed that the apoptotic index in bcl-2 positive expression group was lower than that in bcl-2 negative expression group ($P<0.01$). **Conclusion** The expression of bcl-2 gene can inhibit apoptosis in gastric carcinoma and its precancerous lesions. The abnormal regulation of apoptosis may play an important role in the pathogenesis of gastric carcinoma.

Key words: stomach neoplasm; precancerous lesion; gene expression; apoptosis

---

基金项目:全军"九五"医药卫生重点课题(96Z047)及重庆市应用基础研究资助项目(1998)
Supported by the "Nineth Five-year Plan" for Key Research Project of Medical Science of PLA (96Z047) and the Research Project Foundation for Basic Research and Application of Chongqing (1998)

作者简介:刘海峰(1965—),男,河北省景县人,博士,副主任医师,副教授,主要从事胃癌的发病机制及其防治方面的研究,发表论文55篇。电话:(023)68754000-73055

收稿日期:2003-02-17;修回日期:2003-08-05

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

胃癌的发生发展不仅与肿瘤细胞的增殖而且与其凋亡有密切关系[1]。bcl-2 是细胞凋亡的重要调控基因, 可抑制多种组织的细胞凋亡, 了解胃粘膜上皮细胞恶性转化过程中 bcl-2 基因表达状态的变化及其与细胞凋亡异常之间的关系有助于揭示胃癌发生的机制。本研究采用原位杂交和免疫组织化学染色技术从核酸转录、蛋白表达两个水平对不同胃粘膜病变中的 bcl-2 基因表达状况进行检测, 并应用细胞凋亡原位检测方法对不同胃粘膜病变中细胞凋亡的情况进行观察, 探讨其与 bcl-2 蛋白表达之间可能的关系。

1　材料和方法

1.1　材料

收集我院 1994— 1996 年胃镜活检标本和胃癌手术切除标本共 135 例。其中正常胃粘膜 10 例, 慢性胃炎伴萎缩者 16 例, 伴肠化生者 36 例, 伴中、重度异型增生者 20 例, 胃癌 53 例。胃镜活检标本均取自胃窦部, 53 例胃癌均为胃远端癌。胃癌患者在手术前均未接受化疗、放疗或免疫治疗。组织标本经 100 ml/L 福尔马林固定, 石蜡包埋, 4 μm 厚连续切片, 并经 HE 染色病理诊断证实。兔抗人 bcl-2 单克隆抗体购自 Santa Cruz 公司; S-P 免疫染色试剂盒购于福建迈新生物工程公司; 地高辛标记及检测试剂盒以及细胞凋亡原位检测试剂盒均为 Boehringer Mannheim 公司产品。bcl-2 寡核苷酸探针由中科院上海生物工程研究中心合成。探针序列为: 5′-GGGAAACACCAGAATCAAGT-3′。探针标记按试剂盒说明进行, 探针标记后分别作探针显色灵敏度及杂交灵敏度检测。

1.2　方法

1.2.1　原位杂交　　参照 Polak 等[2] 的方法加以改进。所用载玻片和盖玻片经认真清洗, 高压消毒, 载玻片上涂多聚赖氨酸(1 g/L), 室温干燥, 石蜡组织直接贴于载玻片上, 65 ℃烤片 3 h, 二甲苯脱蜡, 乙醇逐级入水后, 用浓度为 100 mg/L 的蛋白酶 K 消化, 37 ℃ 20 min; 4 ml/L 多聚甲醛后固定 5 min, 依次用 2×SSC、三蒸水处理后, 乙醇逐级脱水; 滴加预杂交液(500 ml/L 甲酰胺; 6× SSC, 5 ml/L SDS, 5× Danhardt 溶液: 聚乙烯吡咯烷酮 1 g/L, 牛血清白蛋白 1 g/L, 水溶性聚蔗糖-400 1 g/L, 200 mg/L ssDNA), 42 ℃预杂交 2 h, 吸弃载玻片上预杂交液, 每片滴加 50 μl 杂交液, 置于湿盒中 42 ℃杂交过夜。杂交后按下述程序严格冲洗: 0.1 ml/L SDS 2× SSC 42 ℃ 10 min 2 次, 500 ml/L 甲酰胺 2× SSC 室温 10 min 2 次, 500 ml/L 甲酰胺 0.5× SSC 室温 10 min 2 次, 0.2× SSC 室温 5 min 1 次, 0.1× SSC 室温 2 min 1 次。然后按试剂盒说明进行显色, 结果满意后水洗终止, 封片。除阳性对照外, 设无探针阴性对照及 RNase 处理后的阴性对照。

1.2.2　免疫组化染色　　染色程序按 S-P 法操作常规进行, 第一抗体原液按 1∶100 稀释。设立阳性对照、空白对照和替代对照。光镜下观察免疫组化染色切片的显色反应, 计数 500 个细胞中的阳性细胞数, bcl-2 蛋白表达阳性细胞数≥10%判为阳性, < 10%判为阴性。

1.2.3　凋亡细胞原位检测(TUNEL 染色)　　石蜡切片脱蜡, 逐级入水, 蛋白酶 K (20 mg/L) 37 ℃消化 20 min, PBS (pH 7.4) 洗 5 min, 3 次; 滴加 TUNEL 反应液 37 ℃孵育 1 h, PBS 洗 5 min, 3 次; 滴加抗荧光素抗体-过氧化物酶联结物 37 ℃ 30 min, PBS 洗 5 min, 3 次; DAB 显色, 苏木素复染, 封片。阴性对照设以 PBS 替代 TUNEL 反应液的空白对照, 阳性对照切片经 DNase Ⅰ 预处理 10 min, 再接上述染色步骤。

1.3　统计学分析

采用 χ^2 检验、t 检验和相关分析。

2　结果

原位杂交阳性信号为紫蓝色或棕蓝色颗粒, 在不同胃粘膜病变中呈片状或灶状分布, 主要集中在胞浆内, 见图 1。免疫组化阳性信号呈棕黄色颗粒, 位于细胞浆内和/或细胞膜上, 未见核内表达, 见图 2。bcl-2 基因在不同胃粘膜病变中有不同程度的表达。bcl-2 mRNA 在胃癌组织中的表达率显著高于正常胃粘膜、萎缩性胃炎及肠化生($P<0.01$), 异型增生组织 bcl-2 mRNA 表达率显著高于正常胃粘膜及萎缩性胃炎($P<0.05$)。见表 1。胃癌组织 bcl-2 蛋白表达率显著高于正常胃粘膜、萎缩性胃炎及肠化生($P<0.01$), 异型增生组织 bcl-2 蛋白表达率显著高于正常胃粘膜及萎缩性胃炎($P<0.01$)。见表 2。四格表 χ^2 检验表明, 原位杂交及免疫组化两种方法对 bcl-2 基因表达检测结果一致性非常显著($P<0.01$), 135 例标本中两种方法检测结果一致者占 84.44%(114/135), 同时发现两法的差异则未达到显著界限($P>0.05$)。



图 1　胃癌组织, **bcl-2 mRNA** 表达阳性　(ISH×200)

Fig 1　Positive expression of bcl-2 mRNA in gastric carcinoma tissue　(ISH×200)

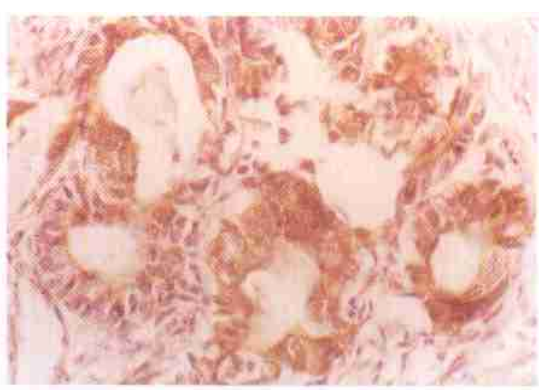


图 2　胃癌组织, **bcl-2** 蛋白表达阳性细胞呈弥漫性分布　(S-P×200)

Fig 2　Diffuse distribution of cells with positive expression of bcl-2 protein in gastric carcinoma tissue　(S-P×200)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表 1 bcl-2 mRNA 在不同胃粘膜病变中的表达

Tab 1 Expression of bcl-2 mRNA in gastric epithelia in normal mucosa, precancerous lesions, and gastric carcinoma

Group	*n*	bcl-2 mRNA positive	Expression rate (%)
N	10	2	20.00
CAG	16	4	25.00
IM	36	16	44.44
Dys	20	14	75.00 *
GC	53	41	77.36 **

N: Normal gastric musoca; CAG: Chronic atrophic gastritis; IM: Intestinal metaplasia; Dys: Gastric dysplasia; GC: Gastric carcinoma.

*: $P<0.05$, *vs* N, CAG and IM; **: $P<0.01$, *vs* N, CAG and IM

表 2 不同胃粘膜病变中 bcl-2 蛋白免疫组化研究结果

Tab 2 Expression of bcl-2 protein in gastric epithelia in normal mucosa, precancerous lesions, and gastric carcinoma

Group	*n*	bcl-2 protein positive	Expression rate (%)
N	10	2	20.00
AG	16	5	31.25
IM	36	19	52.78
Dys	20	15	75.00 *
GC	53	43	81.13 **

Abbreviation same as Tab 1. *: $P<0.01$, *vs* N and CAG; **: $P<0.01$, *vs* N, CAG and IM

TUNEL 染色阳性反应物质呈棕黄色, 位于细胞核内, 浓缩的核质紧贴于核膜, 或核质呈现均匀的染色, 凋亡细胞在不同胃粘膜病变中呈弥漫性分布、簇状分布和/或散在分布, 见图 3; 未凋亡细胞非特异性染色极浅, 而坏死组织染色呈片状, 细胞轮廓不清, 染色呈均一深染的棕黄色斑片。比较不同胃粘膜病变中 bcl-2 蛋白表达阳性组和阴性组的细胞凋亡指数, 发现肠化生及胃癌组织中 bcl-2 蛋白表达阳性组显著低于其阴性组($P<0.05$ 及 $P<0.01$), 异型增生及萎缩性胃炎中 bcl-2 蛋白表达阳性组亦低于其阴性组, 但相差无统计学意义。见表 3。经秩相关分析发现, bcl-2 蛋白表达状态与细胞凋亡指数呈负相关($r=-0.696$, $P<0.01$)。经连续切片观察, bcl-2 蛋白表达与细胞凋亡在多数病例具有同域性。

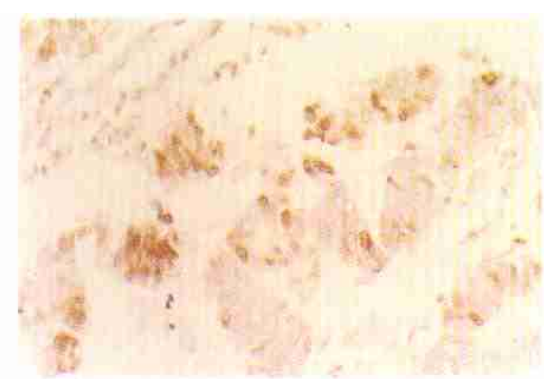


图 3 胃癌组织, 凋亡细胞呈簇状分布分布 (TUNEL× 200)

Fig 2 Apoptotic cells distributed in clustered form in gastric carcinoma tissue (TUNEL× 200)

表 3 不同胃粘膜病变中 bcl-2 蛋白表达与细胞凋亡的关系

Tab 3 Relationship between bcl-2 protein expression and apoptosis

Group	bcl-2 protein positive		bcl-2 protein negative	
	n	Apoptotic index (%)	*n*	Apoptotic index (%)
CAG	5	10.32±5.39	11	12.68±7.11
IM	19	13.05±5.92 *	17	17.13±6.03
Dys	14	7.18±3.29	6	8.89±4.16
GC	43	5.12±2.21 **	10	8.68±3.34

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* bcl-2 protein negative group

3 讨论

胃癌的发生发展可能伴随着一系列基因的改变, 探讨胃粘膜癌变过程中细胞凋亡相关基因 bcl-2 的表达状况, 有助于揭示胃癌发生的机制。bcl-2 基因是 Tsujimoto 等在 1985 年研究人滤泡性非霍奇金淋巴瘤患者染色体 $t(14;18)$易位时发现的一个基因, 编码两个结构相近的蛋白质片段: bcl-2α (26 000)和 bcl-2β (21 000)。bcl-2 蛋白对细胞凋亡具有直接调节的作用, 能够抑制许多因素引起的细胞凋亡, 但并不能刺激增殖, 而是促进非增殖细胞的存活[3]。研究表明, bcl-2 不仅存在于 T 及 B 淋巴细胞, 在未成熟的造血细胞、上皮细胞、神经细胞及多种癌细胞中均有表达[4~6]。迄今为止, bcl-2 基因在胃癌前病变及胃癌中的表达状况及其与细胞凋亡的关系尚少见文献报道。本研究表明, 在正常胃粘膜、胃癌前病变及胃癌组织中 bcl-2 基因在 mRNA 和蛋白水平均有不同程度的表达, bcl-2 蛋白与 bcl-2 mRNA 检测结果有密切关系, 提示在胃粘膜癌变过程中不仅存在 bcl-2 蛋白水平表达异常, 而且存在核酸转录水平的异常, bcl-2 蛋白异常表达的原因还应包括 bcl-2 基因转录异常的因素。

细胞凋亡是由基因调控的细胞主动死亡过程, 此过程的异常与肿瘤的发生发展有密切关系, 一种组织中细胞的凋亡易感性决定于多种凋亡相关基因产物的水平和相互的作用, 存在多种调定点构成的复杂调控系统[7,8]。我们既往的研究工作已经证实, 胃粘膜癌变过程中不仅存在活跃的细胞增殖, 而且存在细胞凋亡的异常, 细胞过度增殖和(或)细胞凋亡减少是胃癌发生的生物学基础[1]。但胃粘膜癌变过程中细胞凋亡异常的机制尚不明确, 可能与细胞凋亡相关基因调控失常有关。本研究表明, bcl-2 蛋白表达状态与细胞凋亡指数呈负相关, bcl-2 蛋白表达阳性肠化生、胃癌组织中的凋亡细胞指数显著低于其阴性组。表明 bcl-2 基因参与了对胃粘膜细胞恶性转化过程中细胞凋亡的调控, 对胃癌前病变及胃癌细胞凋亡具有抑制性调控作用, bcl-2 基因表达异常可能是胃粘膜癌变过程中细胞凋亡异常的主要调控机制之一, 细胞凋亡调控异常在

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

胃癌发病中可能起重要作用。

参考文献：

[1] 刘海峰, 刘为纹, 房殿春. 胃癌及其胃癌前病变中细胞凋亡与细胞增殖间关系的研究[J]. 世界华人消化杂志, 1999, 7(8): 649－651.

[2] Polak J M, McGee J O. *In situ* hybridization: Principles and practice[M]. New York: Oxford University Press, 1990. 59－65.

[3] Oltvai Z N, Milliman C L, Korsmeyer S J. Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death [J]. Cell, 1993, 74(4): 609－619.

[4] Heckman C A, Mehew J W, Boxer L M. NF-kappaB activates Bcl-2 expression in t(14;18) lymphoma cells[J]. Oncogene, 2002, 21(24): 3898－3908.

[5] Gobe G, Rubin M, Williams G, *et al*. Apoptosis and expression of Bcl-2, Bcl-XL, and Bax in renal cell carcinomas[J]. Cancer Invest, 2002, 20(3): 324－332.

[6] Satomi D, Takiguchi N, Koda K, *et al*. Apoptosis and apoptosis-associated gene products related to the response to neoadjuvant chemotherapy for gastric cancer[J]. Int J Oncol, 2002, 20(6): 1167－1171.

[7] Que F G, Gores G J. Cell death by apoptosis: basic concepts and disease relevance for the gastroenterologist[J]. Gastroenterology, 1996, 110(4): 1238－1243.

[8] Solary E, Dubrez L, Eymin B. The role of apoptosis in the pathogenesis and treatment of diseases[J]. Eur Respir J, 1996, 9(6): 1293－1305.

（编辑 陈聪连）

文章编号：1000-5404(2004)07-0583-02

个案与短篇

带膜金属支架治疗食管恶性狭窄

Therapeutic effects of coated metallic stent in treating malignant esophageal stricture

严景恩[1], 张伟国[1], 罗香国[1], 李志平[2] （第三军医大学大坪医院野战外科研究所：[1] 放射科, [2] 全军胸外科中心, 重庆 400042）

晚期食管癌患者的病人，由于癌症的侵蚀，食管越来越狭小，严重影响到病人的饮食问题，病人的营养得不到保证，体质下降，直接危及患者的生命，并且影响到对肿瘤的放化疗工作。近几年开展的食管支架置入术是治疗食管恶性狭窄的有效方法之一，临床运用日趋广泛。我院从 2000 年 11 月至 2003 年 8 月总共开展食管支架置入术 52 例取得了明显的临床疗效，报告如下。

1 材料和方法

1.1 一般资料

本组病人 52 例，其中男性 38 例，女性 14 例，年龄 50～75 岁，平均 61 岁，均为无手术指征的晚期食管癌引起的食道狭窄。使用的支架是镍钛记忆合金自扩式带膜食道支架。

1.2 方法

术前 1 d 做食道钡餐检查，确定狭窄部位位置，狭窄段直径及长度，以选择适当的内支架，术前做心电图检查、血常规、出凝血时间，术前 6 h 禁食，术前 30 min 肌肉注射阿托品 0.5 mg，用地卡因作咽部表面喷雾麻醉，另外还可用几根棉纤蘸地卡因压在舌根部数分钟，以充分麻醉咽喉部。预先将内支架用冰冷却变形，放入放送器内，用 75%的酒精浸泡 15 min 以上消毒，或按内镜消毒规程消毒。

患者仰卧床上，在 X 线透视下，经口缓慢将胃管插进食管内到达狭窄上端，这时通过胃管注入一定量的泛影葡液，反复造影，结合最近的食管钡餐片，确定狭窄的上下两端，在透视下把金属标志标在狭窄的上下两端。通过胃管轻轻地放入食道导丝，一直放到胃中，根据狭窄程度用扩张器或球囊预扩几次狭窄部位，然后将装有食管支架的放送器通过导丝导引送到食管狭窄部，固定内鞘，后通外鞘，在 X 线透视下缓慢地释放出支架。释放过程中注意支架上下端的位置不能移动。释放后核实支架的位置及膨胀情况。待内支架膨胀后，退出放送器和导丝，口服造影剂观察支架膨胀情况。

1.3 术后观察及护理

术后口服温开水及粘膜保护剂，促使支架尽快膨胀，使之与食管壁紧密附着，以防支架移位[1]。粘膜保护剂可减轻支架对食管粘膜的刺激，减轻局部渗血。术后给予抗菌治疗 3 d，观察呕吐物及大便颜色，对有出血者可口服止血药。

2 结果

52 例患者共置入支架 53 个，1 例因狭窄段太长，第 1 个支架置入时，因支架稍有移动，狭窄段未能全部覆盖，又补 1 个支架。对不完全膨胀的支架不必进行扩张，这种情况有助于防止支架上下移动，同时支架在食管内自然缓慢膨胀，可缓解病人的痛苦。3～4 d 后复查，支架全部膨胀良好。术后大部分病人胸骨后有轻度不适、异物感，未做特殊处理，2～3 d 后症状自行消失。1 例痛疼剧烈，经检查未发现其它情况，给予镇静止痛，未出现与支架置入直接有关的大出血食管穿孔或破裂等严重并发症。

作者简介：严景恩（1967－），男，河南省扶沟县人，主管技师，主要从事介入放射技术方面的，电话：(023)68757950

收稿日期：2003-10-25；修回日期：2004-01-06

（下转 590 页）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net